

**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : B01L 3/00 // G01N 21/05, 33/48, 33/50, C12M 1/14, C12Q 1/68		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/30752
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	2. Juni 2000, (02.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/08891		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 19. November 1999 (19.11.99)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Mit geänderten Ansprüchen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 198 53 640.2 20. November 1998 (20.11.98) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MOLECULAR MACHINES & INDUSTRIES GMBH [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 515, D-69120 Heidelberg (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÖSCHER, Frank [DE/DE]; An der Neckarspitze 6, D-69115 Heidelberg (DE). MEIER, Dirk [DE/DE]; Im Hirtenstück 16, D-69151 Neckargemünd (DE). SCHUBERT, Peter [DE/DE]; Jahnstrasse 127, D-64285 Darmstadt (DE). SEEGER, Stefan [DE/DE]; Goethestrasse 2, D-93077 Bad Abbach (DE).			
(74) Anwälte: KINDLER, Matthias usw.; Hoffmann - Eitle, Arabellastrasse 4, D-81925 München (DE).			

(54) Title: **MULTIPLE-CONTAINER SYSTEMS WITH IMPROVED SENSITIVITY FOR OPTICAL ANALYSES**

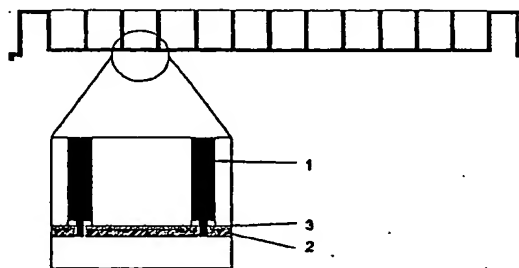
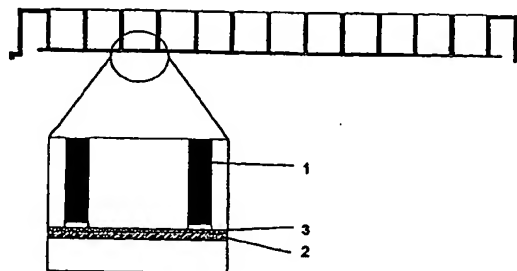
(54) Bezeichnung: **MEHRGEFÄSSANORDNUNGEN MIT VERBESSERTER EMPFINDLICHKEIT FÜR DIE OPTISCHE ANALYTIK**

(57) Abstract

The invention relates to multiple-container systems and to the use of same for optical assays. The invention relates in particular to a multiple-container system comprising a container wall matrix (1) with continuous cavities and one or more optically transparent base plates (2) joined to the container wall matrix.aid system is characterized in that the base plates are coated with a film (3) having functional groups suitable for the covalent immobilization of molecules. The film on the base plate is preferably a Langmuir-Blodgett film, and preferably a Langmuir-Blodgett film on cellulose basis. The invention further relates to multiple-container systems comprising a container wall matrix with continuous cavities and one or more optically transparent base plates joined to the container wall matrix. Said systems are characterized in that the base plates are coated with a film derivatized with receptor molecules or molecules presenting low non-specific protein adsorption.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Mehrgefäßanordnungen sowie die Verwendung dieser Mehrgefäßanordnungen für optische Assays. Insbesondere stellt die Erfindung eine Mehrgefäßanordnung bereit, umfassend eine Gefäßwandmatrix (1) mit durchgehenden Vertiefungen und eine oder mehrere daran angebrachte optisch transparente Bodenplatte(n) (2), dadurch gekennzeichnet, daß die Bodenplatte(n) mit einem Film (3) mit zur kovalenten Immobilisierung von Molekülen geeigneten funktionellen Gruppen beschichtet ist (sind). Der Film auf der Bodenplatte ist vorzugsweise ein Langmuir-Blodgett-Film, besonders bevorzugt ein Langmuir-Blodgett-Film auf Cellulose-Basis. Weiterhin stellt die Erfindung Mehrgefäßanordnungen bereit, umfassend eine Gefäßwandmatrix mit durchgehenden Vertiefungen und eine oder mehrere daran angebrachte optisch transparente Bodenplatte(n), die dadurch gekennzeichnet sind, daß die Bodenplatte(n) mit einem Film beschichtet ist (sind), der mit Rezeptormolekülen oder Molekülen derivatisiert ist, die eine geringe unspezifische Proteinadsorption aufweisen.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Mehrgefäßanordnungen mit verbesserter Empfindlichkeit
für die optische Analytik

Die Erfindung betrifft Mehrgefäßanordnungen sowie die Verwendung dieser Mehrgefäßanordnungen.

Mehrgefäßanordnungen wie z.B. Mikrotiterplatten sind zu einem Standard in der biochemischen Analytik geworden, da sie insbesondere den Vorteil aufweisen, eine Vielzahl von Analysen oder Assays parallel und automatisiert zu ermöglichen. Solche Assays schließen beispielsweise ELISA-Tests (Enzyme-linked Immunosorbant Assays), die Bestimmung der Konzentration von Chemikalien, Proteinen und DNA, die Bestimmung der α -, β - und/oder γ -Strahlung bei Szintillationsmessungen, Fluoreszenz-, Phosphoreszenz- oder Lumineszenzmessungen etc. ein. Weiterhin haben sich Mehrgefäßanordnungen auch für die automatisierte Analyse an Zellkulturen als vorteilhaft erwiesen. Im Regelfall erfolgt die Analyse derart, daß die Proben in den Mehrgefäßanordnungen mit Licht aus dem UV/VIS-Wellenlängenbereich bestrahlt werden und die Absorption bzw. Emission der Proben durch geeignete Detektoren bestimmt wird. Die Empfindlichkeit dieser Messungen war jedoch aufgrund der optischen Eigenschaften der für die Herstellung der Mehrgefäßanordnungen verwendeten Kunststoffe, i.d.R. Polystyrol, beschränkt. Daher sind in jüngster Zeit Anstrengungen unternommen worden, die optischen Eigenschaften der Mehrgefäßanordnungen durch Wahl geeigneter Materialien bzw. durch Wahl geeigneter Geometrien der Mehrgefäßanordnungen zu verbessern. So offenbart die Europäische Patentanmeldung EP 0 797 088 A1 Mehrgefäßanordnungen mit Böden aus Kunststoffmaterialien, die eine besonders hohe UV-Durchlässigkeit aufweisen. Die

Empfindlichkeit solcher Mehrgefäßanordnungen ist jedoch nach wie vor für eine Vielzahl von Assays, bei denen teilweise nur geringste Probenmengen bis hinunter zum Einzelmolekül zu analysieren sind, wie beispielsweise bei durch kombinatorische Chemie hergestellten Substanzbibliotheken, unzureichend.

Es ist daher die erfindungsgemäße Aufgabe, Mehrgefäßanordnungen mit einer verbesserten Empfindlichkeit für optische Analyseverfahren bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine Mehrgefäßanordnung, umfassend eine Gefäßwandmatrix (1) mit durchgehenden Vertiefungen und eine oder mehrere daran angebrachte optisch transparente Bodenplatte(n) (2), dadurch gekennzeichnet, daß die Bodenplatte(n) mit einem Film (3) mit zur kovalenten Immobilisierung von Molekülen geeigneten funktionellen Gruppen beschichtet ist (sind).

Die Figuren 1 und 2 zeigen bevorzugte erfindungsgemäße Mehrgefäßanordnungen. Figur 1 zeigt eine erfindungsgemäße Mehrgefäßanordnung, umfassend eine Gefäßwandmatrix (1) mit durchgehenden Vertiefungen und eine daran angebrachte optisch transparente Bodenplatte (2), die mit dem Film (3) beschichtet ist. Figur 2 zeigt eine erfindungsgemäße Mehrgefäßanordnung, umfassend eine Gefäßwandmatrix (1) mit durchgehenden Vertiefungen und mehrere daran angebrachte optisch transparente Bodenplatten (2), die mit dem Film (3) beschichtet sind, wobei pro Vertiefung der Gefäßwandmatrix eine Bodenplatte vorliegt.

Die erfindungsgemäßen Mehrgefäßanordnungen ermöglichen im Gegensatz zu den Mehrgefäßanordnungen des Standes der Technik eine unabhängige Kontrolle der Oberflächeneigenschaften des Bodens der Mehrgefäßanordnung, durch den bzw. an dem die optische Analytik durchgeführt wird, und der Gefäßwand, die lediglich zur Aufbewahrung der Flüssigkeit dient und für die

Analyse in der Regel nicht wesentlich ist. Durch diese Kontrolle der Oberflächeneigenschaften der Bodenoberfläche kann die Empfindlichkeit optischer Analyseverfahren mit Mehrgefäßanordnungen überraschend erhöht werden.

Die erfindungsgemäße Mehrgefäßanordnung ist bezüglich der Anzahl der Vertiefungen nicht beschränkt und umfaßt insbesondere Mehrgefäßanordnungen mit 24 (4*6), 48 (6*8), 96 (8*12), 384 (16*24), 864 (24*36) bzw. 1536 (32*48) Vertiefungen, ist jedoch nicht auf diese Konfigurationen beschränkt. Die Vorzüge der Erfindung werden jedoch mit zunehmender Anzahl an Vertiefungen deutlicher, da diese mit einem zunehmenden Oberflächen-Volumen-Verhältnis einhergeht, d.h. Oberflächeneffekte werden bei steigender Anzahl an Vertiefungen relevanter. Die Abmessungen der Mehrgefäßanordnungen orientieren sich vorzugsweise an den Standards der "Society of Biomolecular Screening" (SBS), d.h. die Mehrgefäßanordnung ist vorzugsweise und unabhängig von der Anzahl der Vertiefungen 86 mm breit und 128 mm lang.

Die erfindungsgemäß zu verwendende Gefäßwandmatrix (1) besteht vorzugsweise aus einem Kunststoffmaterial, besonders bevorzugt aus einem solchen Kunststoffmaterial, welches eine möglichst geringe unspezifische Adsorption für die zu analysierende Substanz, wie z.B.. DNA bzw. Proteine aufweist. Bevorzugte Materialien für die Gefäßwandmatrix schliessen Polystyrol, Polycarbonat, Polyethylen und/oder Polypropylen ein. Weiterhin können als Gefäßwandmatrix Kunststoffe erfindungsgemäß verwendet werden, deren Oberflächen mit Substanzen beschichtet sind, die einen Film auf dem Gefäßwandmaterial bilden, der die Adsorption des Analyten an der Gefäßwandmatrix vermindert. Geeignete Substanzen diesbezüglich schliessen insbesondere Rinderserumalbumin, fluorierte Kohlenwasserstoffe, Oligoethylenoxid-haltige Polymere wie beispielsweise Polymere der Substanzklasse Pluronic sowie Polysaccharide wie z.B. Cellulose- und Dextran-Derivate ein. Weiterhin enthält der Kunststoff der

Gefäßwandmatrix (1) vorteilhafterweise eine optisch nicht transparente Substanz wie Titandioxid oder Ruß, um so ein optisches Übersprechen zwischen den einzelnen Vertiefungen zu verhindern. Die Seite der Gefäßwandmatrix (1), die mit der bzw. den Bodenplatten (2) verbunden wird, ist im Regelfall planar, insbesondere bei einer großen Anzahl von Vertiefungen. Bei einer geringeren Anzahl von Vertiefungen und damit i.d.R. einer größeren Fläche einer jeden Vertiefung kann auch jede Vertiefung bzw. eine Gruppe von Vertiefungen, beispielsweise 4 oder 9 Vertiefungen, eine Aussparung in der Größe der daran anzubringenden Bodenplatte aufweisen, d.h. in diesem Fall wird pro Vertiefung bzw. pro Gruppe von Vertiefungen eine Bodenplatte verwendet. Obwohl dies bezüglich der Herstellung nicht bevorzugt ist, kann eine solche erfindungsgemäße Mehrgefäßanordnung bezüglich einer weiteren Empfindlichkeitserhöhung bevorzugt sein, da so ein optisches Übersprechen zwischen den einzelnen Vertiefungen entlang des Boden verhindert werden kann. Die Vertiefungen der erfindungsgemäß verwendeten Gefäßwandmatrix können rund, rechteckig oder quadratisch sein. Erfindungsgemäß bevorzugt sind runde Vertiefungen, da diese bei gleichem Volumen gegenüber den quadratischen Vertiefungen eine geringere Oberfläche aufweisen und daher bei ansonsten gleichen Eigenschaften zu einer geringeren Adsorption des Analyten führen.

Die erfindungsgemäß verwendbare, optisch transparente Bodenplatte (2) der Mehrgefäßanordnung weist vorteilhafterweise in dem Wellenlängenbereich, bei der der Assay durchgeführt wird, eine besonders hohe Transmission auf. Für eine Vielzahl von optischen Messungen ist insbesondere Quarzglas oder Borosilikatglas bevorzugt, jedoch können auch weitere Materialien wie z.B. das 4-Methyl-penten-1-Polymer TPX[®] von Mitsui Petrochemical Industries, Japan bzw. Polymethylmethacrylat verwendet werden. Die erfindungsgemäß verwendete Bodenplatte (2) weist vorzugsweise eine geringe Dicke auf, besonders bevorzugt eine Dicke unter

200 μm , insbesondere 130 bis 170 μm , besonders bevorzugt 150 μm . Eine möglichst dünne Bodenplatte ist insbesondere dann erwünscht, wenn für den zu verwendenden Assay stark fokussiertes Licht bzw. Objektive mit einer hohen numerischen Apertur verwendet werden, wie beispielsweise bei der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Besonders bevorzugt sind Bodenplatten, die eine möglichst geringe Rauigkeit aufweisen. Die Abmessungen der Bodenplatte hängen bei Verwendung einer Bodenplatte pro Vertiefung von der Anzahl der Vertiefungen ab. Bei einer 24er Anordnung kann die Größe ca. 17 mm * 17 mm betragen. Wird nur eine Bodenplatte für die erfindungsgemäße Mehrgefäßanordnung verwendet, so beträgt die Größe der Bodenplatte normalerweise 75 mm * 115 mm.

Der als Beschichtung der Bodenplatte(n) der erfindungsgemäßen Mehrgefäßanordnung verwendete Film (3) mit zur kovalenten Immobilisierung von Molekülen geeigneten funktionellen Gruppen erlaubt eine gezielte Oberflächenmodifizierung der Bodenoberfläche, d.h. der Oberfläche, die für die Analyse relevant ist. Hierdurch kann die Empfindlichkeit von optischen Messungen überraschend erhöht werden.

Die Art des Filmes (3) ist nicht beschränkt, sofern dieser geeignete funktionelle Gruppen aufweist, und umfaßt beispielsweise Silanfilme, Langmuir-Blodgett-Filme und Hydrogel-Filme wie beispielsweise Dextran-Filme.

Die funktionellen Gruppen an diesem Film sind nicht beschränkt und schliessen beispielsweise Hydroxy-, Amino-, Aldehyd-, und Carboxy-Gruppen ein. Vorzugsweise liegen diese Gruppen geschützt vor, d.h. daß vor der kovalenten Immobilisierung von Molekülen an diese Gruppen eine Schutzgruppe abgespalten werden muß. Geeignete Schutzgruppen sind dem Fachmann bekannt.

Der erfindungsgemäß verwendete Film ist vorzugsweise ein Langmuir-Blodgett-Film, insbesondere ein zwei- oder

dreidimensional vernetzbarer Langmuir-Blodgett-Film, besonders bevorzugt ein Langmuir-Blodgett-Film auf Polysaccharid-, insbesondere Cellulosebasis. Vorteilhafterweise ist der erfindungsgemäß verwendbare Film photochemisch vernetzbar. Die erfindungsgemäß verwendbaren Langmuir-Blodgett-Filme weisen den Vorteil auf, daß sie nach Immobilisierung von Rezeptoren eine hohe spezifische Adsorption bei geringer unspezifischer Adsorption aufweisen, lagerstabil sind und eine topologisch sehr definierte Oberfläche bereitstellen.

Die bevorzugten Polysaccharid- oder Cellulose-Derivate für den Langmuir-Blodgett-Film weisen vorzugsgewiese einen Polymerisationsgrad von mehr als 5 und sind besonders bevorzugt gemischte Celluloseether, die a) mindestens einen hydrophoben und b) mindestens einen ein Stickstoff-Atom enthaltenden Substituenten aufweisen.

In bevorzugten Ausführungsformen weisen die gemischten Celluloseether als Substituenten a) eine Trialkylsilyl- und als Substituenten b) eine Aminoalkylgruppe auf, wobei der Alkylrest insbesondere im Substituenten a) 1 oder 2 C-Atome und im Substituenten b) 2 bis 8 C-Atome hat. Zusätzlich kann das Polysaccharidderivat noch c) mindestens einen weiteren Substituenten enthalten, der eine photochemisch, radikalisch oder thermisch vernetzbare Gruppe trägt.

Unter den bevorzugten gemischten Celluloseethern sind vorwiegend solche Verbindungen zu verstehen, bei denen einzelne der OH-Gruppen des Cellulosegrundgerüsts am H durch organische oder Organosilylgruppen ersetzt sind, d.h. das direkt dem O benachbarte Atom ein C oder Si ist. Darüber hinaus können unter dieser Bezeichnung aber auch noch Derivate verstanden werden, die zusätzlich weitere Substituenten (insbesondere am O der OH-Gruppe) tragen, beispielsweise ist der Substituent c) ein solcher. In den konkreten Molekülen (siehe dazu Lothar Brandt in Ullmann's

Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A5, 2. Auflage, Stichwort "Cellulose Ethers", S. 461 ff.) muß nicht jede einzelne Moleküleinheit (Anhydroglucose-Einheit) im Celluloseethermolekül an einer oder mehreren OH-Gruppen substituiert sein, sondern die Verbindungsbezeichnung bezieht sich auf die Gesamtheit der Moleküle bzw. Moleküleinheiten, stellt also eine Mittelwertbezeichnung dar; im allgemeinen sind maximal 3 OH-Gruppen pro Moleküleinheit substituierbar. Zur Herstellung bzw. zum Verhalten von die Substituenten a) oder c) (jedoch nicht b)) enthaltenden Cellulosederivaten wird auf Frank Löscher et al., Proc.SPIE Vol. 2928, 1996, S.209 bis 219 und auf Dieter Klemm et al., Z. Chem., 24. Jg. (1984), Heft 2, S. 62 in "4-Dimethylamino-pyridin-katalysierte Synthese von Celluloseestern über organlösliche Synthese von Celluloseestern über organolösliche Trimethylcellulose" verwiesen.

Zur Beschichtung der Bodenplatte wird mindestens eine monomolekulare Schicht, vorzugsweise 2 bis 10 monomolekulare Schichten des Polysaccharidderivates auf die Bodenplatte aufgebracht, wobei dieses als Substituenten a) bevorzugt einen hydrophoben Substituenten mit Alkyl-, Alkenyl-, Aryl-, Alkylsilyl-, Alkensäilyl- und/oder Arylsilyl-Resten, aber auch andere Substituenten, die den Übertrag auf Oberflächen mit der Langmuir-Blodgett-(LB) und/oder Langmuir-Blodgett-Schäfer-(LBS)-Technik ermöglichen, aufweist.

Die Aufbringung dieser Schicht kann durch Inkubation in einer Lösung, durch einen Self-Assembly-(SA)-Prozeß oder vorzugsweise mit der Langmuir-Blodgett- oder Langmuir-Blodgett-Schäfer-Technik erfolgen. Die Polysaccharidderivate sind geeignet, sowohl auf hydrophilen wie auf hydrophoben Oberflächen zu haften. Somit kann diese Substanzklasse als oberflächenmodifizierender Film aufgetragen und verwendet werden.

Eine zusätzliche Stabilisierung erfahren diese Schichten, wenn photopolymerisierbare oder thermisch polymerisierbare Gruppen in das/die Molekül(e) eingebaut werden, z.B. Cinnamoylgruppen, aber auch alle anderen in der Chemie bekannten Gruppen, da diese durch die Polymerisation vor, während und nach der Übertragung die Schicht vernetzend stabilisieren.

Hierbei können die polymerisierbaren Gruppen entweder am obengenannten Polysaccharidderivat angebracht sein oder aber in Form eines weiteren Moleküls, das vermischt mit dem Polysaccharidderivat auf oder in die Schicht aufgebracht wird, vorliegen. Die Polymerisation kann innerhalb einer Monolage stattfinden; sind jedoch mehrere Monolagen übereinander vorhanden, kann die Polymerisation auch zwischen Molekülen der einzelnen Schichten stattfinden.

Die erfindungsgemäße MehrgefäÙanordnung kann wie folgt hergestellt werden.

Die Bodenplatte wird mit dem Film beschichtet, beispielsweise mit dem oben beschriebenen Langmuir-Blodgett-Film. Eine vorgeformte GefäÙwandmatrix, beispielsweise eine durch Spritzguß von Polystyrol hergestellte GefäÙwandmatrix, wird in einem getrennten Arbeitsgang zunächst gereinigt, beispielsweise durch Ultraschallbehandlung. Anschließend wird die GefäÙwandmatrix vorzugsweise in eine Lösung enthaltend eine Substanz, die die Adsorption von Analyten wie Protein bzw. DNA an der Wand der GefäÙwandmatrix herabsetzt, wie beispielsweise in das Rinderserumalbumin, getaucht. Anschließend erfolgt eine Trocknung der GefäÙwandmatrix.

An den Kanten der GefäÙwandmatrix, die die Kontaktfläche mit der aufzubringenden Bodenplatte bilden sollen, wird dann ein Kleber, beispielsweise mit Hilfe einer Rolle, angebracht, beispielsweise ein Silikonkautschukkleber, ein Epoxidharzklebstoff oder ein Acrylatkleber (z.B. Loctite).

Besonders bevorzugt sind lichtaktivierbare Einkomponentenkleber. Die so vorbehandelte Gefäßwandmatrix wird vorsichtig auf die mit dem Langmuir-Blodgett-Film beschichtete Bodenplatte gedrückt. Alternativ kann der Kleber auch direkt auf die Bodenplatte mit Hilfe der Siebdrucktechnik in einem Muster aufgetragen werden, welches der Kontaktfläche mit der Gefäßwandmatrix entspricht. So wird die erfindungsgemäße Mehrgefäßanordnung erhalten. Die aufgeklebte Bodenplatte weist vorzugsweise nur einen minimalen Niveauunterschied von ca. 1 mm zur äußeren Kante des Kunststoffkörpers auf. Somit wird gewährleistet, daß sämtliche Vertiefungen der erfindungsgemäßen Mehrgefäßanordnung optisch von der Bodenseite vermessen werden können und es zu keiner sterischen Behinderung der Meßoptik durch den Rand der Gefäßwandmatrix kommt.

Nach erfolgter Herstellung der erfindungsgemäßen Mehrgefäßanordnung wird die Oberfläche vorzugsweise mit einem Deckel und/oder einer Folie geschützt. Der Deckel ist vorzugsweise so konstruiert, daß er auf der Oberseite einer erfindungsgemäßen Mehrgefäßanordnung zwangspositioniert ist. Desweiteren ermöglicht er auch das zwangspositionierte Stapeln der Mehrgefäßanordnungen. Die Größe des Deckels beträgt vorzugsweise etwa 86 mm*128mm*8mm. Die Verwendung einer Folie weist den Vorteil auf, daß die Oberfläche der Bodenplatte auch dann geschützt bleibt, wenn beispielsweise in eine Vertiefung mittels einer Spritze mit Nadel, die durch die Folie hindurchgestochen wird, Flüssigkeit eingegeben wird.

An den Boden einer erfindungsgemäßen Mehrgefäßanordnung können dann für die Durchführung von optischen Assays Moleküle kovalent angekoppelt werden, die abhängig von der Art des Analyseverfahrens bzw. Assays die Oberflächeneigenschaften bestimmen. Hierbei ist zwischen homogenen und heterogenen Assays zu unterscheiden, d.h. Assays, bei denen der Analyt in Lösung vorliegt, und Assays,

bei denen der Analyt, wie z.B. ein Rezeptor oder Ligand, an einem an einer Oberfläche befindlichen Liganden oder Rezeptor bindet. Zu den homogenen Assays, bei denen die erfindungsgemäße Mehrgefäßanordnung besonders vorteilhaft zu verwenden ist, gehören die Fluoreszenzkorrelations-Assays, Fluoreszenzpolarisations-Immunsorbent-Assay und Förster-Energietransfer-Assays. Zu den heterogenen Assays, bei denen die erfindungsgemäße Mehrgefäßanordnung besonders vorteilhaft zu verwenden ist, gehören alle optischen Assays, bei denen eine Aufkonzentrierung des Analyten an der Bodenoberfläche vorteilhaft ist, wie z.B. Evaneszenzassays oder Assays, bei denen zur Anregung von Fluoreszenz mit einem stark fokussierten Laserstrahl die Oberfläche abgerastert wird.

Abhängig von der Art des Assays wird die Oberflächenfilm auf der Bodenplatte mit Molekülen derivatisiert. Während bei homogenen Assays durch die Immobilisierung von Molekülen auf eine möglichst geringe Adsorption des Analyten abgezielt wird, um so eine hohe Beweglichkeit des Analyten an der Oberfläche sicherzustellen, wird bei heterogenen Assays auf die Immobilisierung des Analyten abgezielt. Bei homogenen Assays wird daher der Film vorzugsweise mit beispielsweise Rinderserumalbumin, Oligoethylenoxidentketten-haltigen Substanzen, fluorierten Kohlenwasserstoffen oder Polysacchariden wie Cellulose- oder Dextran-Derivaten modifiziert. Bei heterogenen Assays werden hingegen an den Film Substanzen gekoppelt, die den Analyten zu binden vermögen. Abhängig von der Art des Analyten weiß der Fachmann, wie geeignete Substanzen auszuwählen sind, die den Analyten zu binden vermögen, beispielsweise, DNA, Proteine wie z.B. Antikörper oder Peptide.

Eine kovalente Immobilisierung der Moleküle kann direkt an die reaktiven Gruppen des Oberflächenfilms oder nach vorheriger Abspaltung von Schutzgruppen erfolgen. Im Falle der oben beschriebenen Langmuir-Blodgett-Filme eignen sich beispielsweise zur direkten Ankopplung von Molekülen die

vorhandenen Aminoalkylgruppen. Die Aminoalkylgruppen dienen als nukleophiles Agens und bilden kovalente Bindungen mit elektrophile Gruppen tragenden Molekülen. Andererseits können, sofern die Filme Silylgruppen, z.B. Trialkyl-, Triaryl- oder Trialkenylsilylgruppen, aufweisen, die Oberflächeneigenschaften in der Weise verändert werden, daß die Silylgruppen nach der Beschichtung abgespalten werden, so daß Hydroxygruppen verbleiben. Dies kann z.B. durch die Einwirkung von Säure erreicht werden. Diese Hydroxygruppen können dann als funktionelle Gruppen für die kovalente Immobilisierung dienen.

Nach der Immobilisierung der Moleküle können die Assays in dem Fachmann geläufiger Art und Weise durchgeführt werden.

Vergleichsversuche

1. Beispiel 1

- (a) Eine Glasplatte wurde mit einer Schicht Aminoalkyl-trimethylsilyl-ethercellulose (ATMSC) und anschließend mit einer Schicht Cinnamoyltrimethylsilyl-ethercellulose (CTMSC) beschichtet. Bezüglich der Details des Beschichtungsverfahrens wird auf "ultrathin cellulose based layers for detection of single antigen molecules, Advanced Materials 1998, 10, Nr. 13" verwiesen. Anschließend wurde über eine Lemieux-Oxidation Streptavidin an die Cellulose-Oberfläche gekoppelt (siehe beigelegte Publikation).
- (b) Parallel hierzu wurde ein Kunststoffrahmen, d.h. die Gefäßwandmatrix, 1 Stunde lang bei Raumtemperatur mit 0,2 mg/ml Rinderserum-Albumin inkubiert.
- (c) Anschließend wurde der Kunststoffrahmen an die Cellulose-modifizierte Glasplatte geklebt.
- (d) Zur Messung wurden dann 0,08 ml 10^{-10} M Biotin-CY5-Konjugat, synthetisiert an der Universität Regensburg, in die Vertiefungen der Mehrgefäßanordnung einpipettiert und hierin 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurde zweimal mit Phosphatpuffer (PBS) gewaschen, und die Bindung des Biotin-CY5-Konjugats an der Oberfläche wurde fluoreszenzspektroskopisch durch konfokale Fluoreszenzspektroskopie mit einem LB8[®]-Counter (MMI GmbH, Heidelberg) gemessen. Es wurden 10 Linien mit je 0,5 mm und 2.000 Messpunkten pro Linie gemessen. Die Messzeit pro Punkt betrug 0,5 msec. 300 counts wurden als ein Event gewertet. Die Messung wurde zweimal durchgeführt.

- (e) Es wurden Werte von 43.892 Events bzw. 46.253 Events erhalten.

2. Beispiel 2

Die Mehrgefäßanordnung wurde wie in dem Beispiel 1 hergestellt, nur dass der Kunststoffrahmen nicht mit 0,2 mg/ml Rinderserum-Albumin inkubiert wurde, sondern mit 0,1 mg/ml Streptavidin. Auch die nachfolgende Messung wurde wie in dem erfindungsgemäßen Beispiel durchgeführt, nur dass Werte von 1.663 Events bzw. 2.170 Events erhalten wurden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Mehrgefäßanordnung, umfassend eine Gefäßwandmatrix (1) mit durchgehenden Vertiefungen und eine oder mehrere daran angebrachte optisch transparente Bodenplatte(n) (2), dadurch gekennzeichnet, daß ausschließlich die Bodenplatte(n) mit einem Film (3) mit zur kovalenten Immobilisierung von Molekülen geeigneten funktionellen Gruppen beschichtet ist (sind).
2. Mehrgefäßanordnung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Gefäßwandmatrix (1) aus Kunststoff besteht.
3. Mehrgefäßanordnung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Gefäßwandmatrix (1) aus einem lichtundurchlässigen Material besteht.
4. Mehrgefäßanordnung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Bodenplatte(n) (2) aus Quarzglas besteht (bestehen).
5. Mehrgefäßanordnung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Film (3) ein Langmuir-Blodgett-Film ist.
6. Mehrgefäßanordnung gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Langmuir-Blodgett-Film ein Langmuir-Blodgett-Film auf Cellulose-Basis ist.
7. Mehrgefäßanordnung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Bodenplatte(n) (2)

mit Hilfe eines Klebers an der Gefäßwandmatrix angebracht ist (sind).

8. Mehrgefäßanordnung gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Kleber ein mit Licht härtbarer Kleber ist.

9. Mehrgefäßanordnung umfassend eine Gefäßwandmatrix mit durchgehenden Vertiefungen und eine oder mehrere daran angebrachte optisch transparente Bodenplatte(n), die dadurch gekennzeichnet ist, daß ausschließlich die Bodenplatte(n) mit einem Film beschichtet ist (sind), der mit Rezeptormolekülen derivatisiert ist.

10. Mehrgefäßanordnung umfassend eine Gefäßwandmatrix mit durchgehenden Vertiefungen und eine oder mehrere daran angebrachte optisch transparente Bodenplatte(n), die dadurch gekennzeichnet ist, daß ausschließlich die Bodenplatte(n) mit einem Film beschichtet ist (sind), der mit Molekülen derivatisiert ist, die eine geringe unspezifische Proteinadsorption aufweisen.

11. Verwendung einer Mehrgefäßanordnung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche für optische Analyseverfahren.

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 3. April 2000 (03.04.00) eingegangen;
ursprüngliche Ansprüche 1,5,6 und 10 geänderte; neuer Anspruch 12 hinzugefügt; alle
weiteren Ansprüche unverändert (3 Seiten)]

1. Mehrgefäßanordnung, umfassend eine Gefäßwandmatrix (1) mit durchgehenden Vertiefungen und eine oder mehrere daran angebrachte optisch transparente Bodenplatte(n) (2), dadurch gekennzeichnet, dass ausschließlich die Bodenplatte(n) mit mindestens einer monomolekularen Schicht eines Polysaccharidderivates (3) mit zur kovalenten Immobilisierung von Molekülen geeigneten funktionellen Gruppen beschichtet ist (sind).
2. Mehrgefäßanordnung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Gefäßwandmatrix (1) aus Kunststoff besteht.
3. Mehrgefäßanordnung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Gefäßwandmatrix (1) aus einem lichtundurchlässigen Material besteht.
4. Mehrgefäßanordnung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Bodenplatte(n) (2) aus Quarzglas besteht (bestehen).
5. Mehrgefäßanordnung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine monomolekulare Schicht eines Polysaccharidderivates (3) durch einen Self-Assembly-Prozess oder durch die Langmuir-Blodgett-Technik aufgebracht wurde.
6. Mehrgefäßanordnung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine

monomolekulare Schicht eines Polysaccharidderivates (3) ein Langmuir-Blodgett-Film auf Cellulose-Basis ist.

7. Mehrgefäßanordnung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Bodenplatte(n) (2) mit Hilfe eines Klebers an der Gefäßwandmatrix angebracht ist (sind).

8. Mehrgefäßanordnung gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Kleber ein mit Licht härtbarer Kleber ist.

9. Mehrgefäßanordnung umfassend eine Gefäßwandmatrix mit durchgehenden Vertiefungen und eine oder mehrere daran angebrachte optisch transparente Bodenplatte(n), die dadurch gekennzeichnet ist, dass ausschließlich die Bodenplatte(n) mit einem Film beschichtet ist (sind), der mit Rezeptormolekülen derivatisiert ist.

10. Mehrgefäßanordnung umfassend eine Gefäßwandmatrix mit durchgehenden Vertiefungen und eine oder mehrere daran angebrachte optisch transparente Bodenplatte(n), die dadurch gekennzeichnet ist, dass ausschließlich die Bodenplatte(n) mit einem Film beschichtet ist (sind), der Rinderserumalbumin, Oligoethylenoxidentketten-haltige Substanzen, fluorierte Kohlenwasserstoffe oder Polysaccharide umfasst.

11. Verwendung einer Mehrgefäßanordnung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche für optische Analyseverfahren.

12. Verfahren zur Herstellung einer Mehrgefäßanordnung gemäß einer der Ansprüche 1 bis 8, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Aufbringen mindestens einer monomolekularen Schicht eines Polysaccharidderivates auf die Bodenplatte(n);
- b) Auftragen eines Klebers auf die Kanten der Gefäßwandmatrix, die die Kontaktfläche mit der aufzubringenden Bodenplatte bilden sollen;
- c) Drücken der so behandelten Gefäßwandmatrix an die beschichtete Bodenplatte(n).

Fig. 1

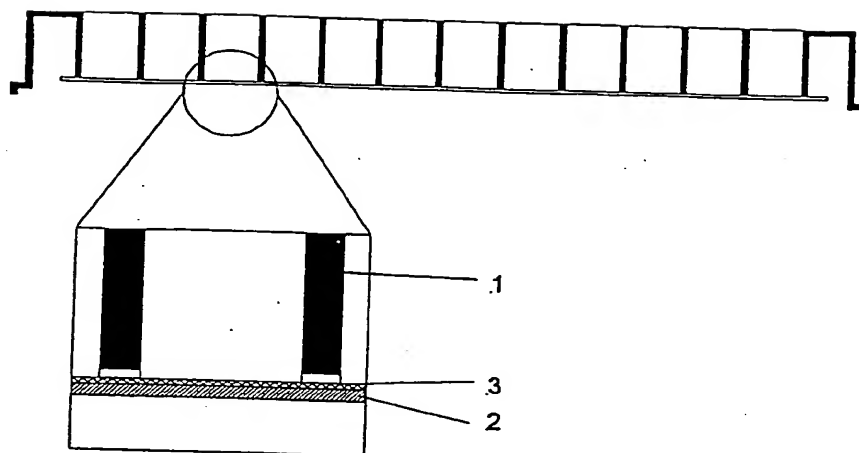
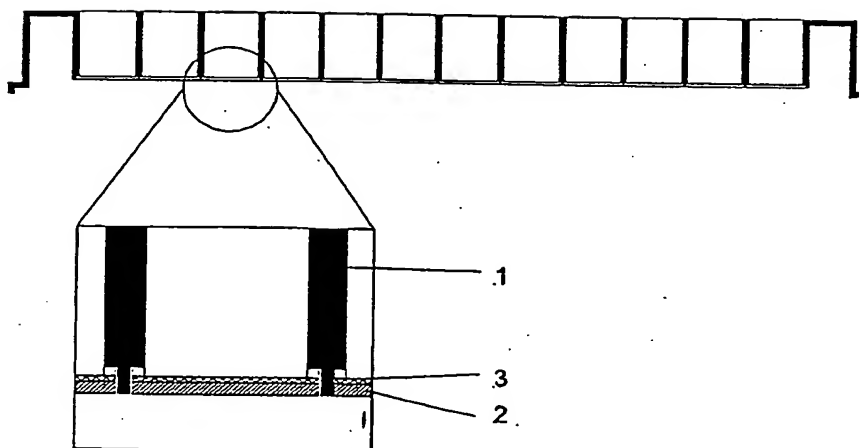


Fig.2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/08891

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B01L3/00 //G01N21/05, G01N33/48, G01N33/50, C12M1/14, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01L G01N C12Q C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 03538 A (BALZERS HOCHVAKUUM ;ARTIFICIAL SENSING INSTR ASI A (CH); RUDIGIER) 2 February 1995 (1995-02-02) page 1, line 2 -page 1, line 14 page 5, line 18 -page 7, line 16 page 7, line 21 -page 7, line 25 figures 1-4 --- -/--	1,4,9,11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 January 2000

Date of mailing of the international search report

04/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Koch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/08891

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>EP 0 347 579 A (MESSERSCHMITT BOELKOW BLOHM) 27 December 1989 (1989-12-27) column 2, line 41 -column 2, line 53 column 3, line 20 -column 3, line 31 column 3, line 37 -column 3, line 44 column 3, line 50 -column 4, line 13 column 5, line 24 -column 5, line 28 column 5, line 34 -column 5, line 45 column 6, line 14 -column 6, line 29 column 8, line 8 -column 8, line 40 figures 1-10</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-3,7,9, 11
A	<p>EP 0 797 088 A (CORNING COSTAR CORP) 24 September 1997 (1997-09-24) cited in the application page 2, line 10 -page 2, line 17 page 2, line 26 -page 2, line 31 page 2, line 47 -page 2, line 52 page 2, line 57 -page 3, line 14 page 4, line 7 -page 4, line 19 page 4, line 39 -page 4, line 58 page 5, line 34 -page 6, line 6 page 6, line 28 -page 6, line 40 figures 1-6 page 3</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4,7, 9-11
A	<p>US 5 236 871 A (FOSSUM ERIC R ET AL) 17 August 1993 (1993-08-17) column 5, line 60 -column 6, line 48 figure 5</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	5,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/08891

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9503538 A	02-02-1995	DE 69420375 D EP 0660924 A JP 8504955 T US 5738825 A	07-10-1999 05-07-1995 28-05-1996 14-04-1998
EP 0347579 A	27-12-1989	DE 3818614 A DE 3825907 A AT 103508 T DE 58907327 D US 5252294 A DE 8817007 U	07-12-1989 01-02-1990 15-04-1994 05-05-1994 12-10-1993 02-10-1991
EP 0797088 A	24-09-1997	US 5858309 A JP 10078388 A	12-01-1999 24-03-1998
US 5236871 A	17-08-1993	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08891

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 B01L3/00 //G01N21/05, G01N33/48, G01N33/50, C12M1/14, C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B01L G01N C12Q C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 03538 A (BALZERS HOCHVAKUUM ;ARTIFICIAL SENSING INSTR ASI A (CH); RUDIGIER) 2. Februar 1995 (1995-02-02) Seite 1, Zeile 2 -Seite 1, Zeile 14 Seite 5, Zeile 18 -Seite 7, Zeile 16 Seite 7, Zeile 21 -Seite 7, Zeile 25 Abbildungen 1-4 --- -/--	1,4,9,11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
 - "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. Januar 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/02/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Koch, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08891

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>EP 0 347 579 A (MESSERSCHMITT BOELKOW BLOHM) 27. Dezember 1989 (1989-12-27)</p> <p>Spalte 2, Zeile 41 -Spalte 2, Zeile 53</p> <p>Spalte 3, Zeile 20 -Spalte 3, Zeile 31</p> <p>Spalte 3, Zeile 37 -Spalte 3, Zeile 44</p> <p>Spalte 3, Zeile 50 -Spalte 4, Zeile 13</p> <p>Spalte 5, Zeile 24 -Spalte 5, Zeile 28</p> <p>Spalte 5, Zeile 34 -Spalte 5, Zeile 45</p> <p>Spalte 6, Zeile 14 -Spalte 6, Zeile 29</p> <p>Spalte 8, Zeile 8 -Spalte 8, Zeile 40</p> <p>Abbildungen 1-10</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-3,7,9,11
A	<p>EP 0 797 088 A (CORNING COSTAR CORP) 24. September 1997 (1997-09-24)</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>Seite 2, Zeile 10 -Seite 2, Zeile 17</p> <p>Seite 2, Zeile 26 -Seite 2, Zeile 31</p> <p>Seite 2, Zeile 47 -Seite 2, Zeile 52</p> <p>Seite 2, Zeile 57 -Seite 3, Zeile 14</p> <p>Seite 4, Zeile 7 -Seite 4, Zeile 19</p> <p>Seite 4, Zeile 39 -Seite 4, Zeile 58</p> <p>Seite 5, Zeile 34 -Seite 6, Zeile 6</p> <p>Seite 6, Zeile 28 -Seite 6, Zeile 40</p> <p>Abbildungen 1-6</p> <p>Seite 3</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4,7,9-11
A	<p>US 5 236 871 A (FOSSUM ERIC R ET AL) 17. August 1993 (1993-08-17)</p> <p>Spalte 5, Zeile 60 -Spalte 6, Zeile 48</p> <p>Abbildung 5</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	5,7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08891

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9503538 A	02-02-1995	DE 69420375 D EP 0660924 A JP 8504955 T US 5738825 A	07-10-1999 05-07-1995 28-05-1996 14-04-1998
EP 0347579 A	27-12-1989	DE 3818614 A DE 3825907 A AT 103508 T DE 58907327 D US 5252294 A DE 8817007 U	07-12-1989 01-02-1990 15-04-1994 05-05-1994 12-10-1993 02-10-1991
EP 0797088 A	24-09-1997	US 5858309 A JP 10078388 A	12-01-1999 24-03-1998
US 5236871 A	17-08-1993	KEINE	

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マコ-ト* (参考)

G 0 1 N 21/03

G 0 1 N 21/03

Z 2 G 0 5 7

B 0 1 L 3/00

B 0 1 L 3/00

4 G 0 5 7

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2000-583628(P2000-583628)
 (86) (22) 出願日 平成11年11月19日 (1999. 11. 19)
 (85) 翻訳文提出日 平成13年5月21日 (2001. 5. 21)
 (86) 国際出願番号 P C T / E P 9 9 / 0 8 8 9 1
 (87) 国際公開番号 W O 0 0 / 3 0 7 5 2
 (87) 国際公開日 平成12年6月2日 (2000. 6. 2)
 (31) 優先権主張番号 1 9 8 5 3 6 4 0 . 2
 (32) 優先日 平成10年11月20日 (1998. 11. 20)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

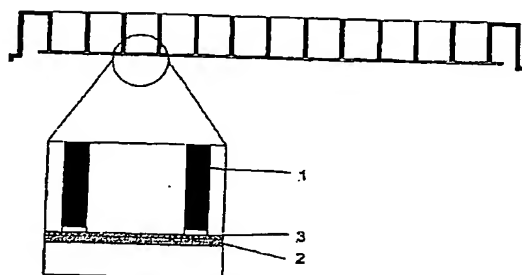
(71) 出願人 モレキュラー マシーンズ アンド イン
 ダストリーズ ゲゼルシャフト ミット
 ベシュレンクテル ハフツング
 ドイツ連邦共和国 ハイデルベルク イム
 ノイエンハイマー フェルト 515
 (72) 発明者 フランク レッシャー
 ドイツ連邦共和国 ハイデルベルク アン
 デア ネッカーシュピッツェ 6
 (72) 発明者 デイルク マイアー
 ドイツ連邦共和国 ネッカーゲミュント
 イム ヒルテンシュテュック 16
 (74) 代理人 弁理士 矢野 敏雄 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光学分析用の改善された感度を有するマルチウェルアセンブリ

(57) 【要約】

本発明は、マルチウェルアセンブリ及び光学的検定のためのその使用に関する。本発明は、殊に、連続キャビティを有するウェルウォールアレイ (1) 及びウェルウォールアレイに結合した1つ又はそれ以上の光学的に透明なボトムプレート (2) を含む複数のコンテナ系に関するものであり、かつ系は、ボトムプレートが、分子の共有結合形での固定化に適した官能基を有するフィルム (3) で被覆されていることにより特徴付けられる。ボトムプレート上のフィルムは、有利にラングミュア-プロジェット膜であり、かつ有利にセルロースペースのラングミュア-プロジェット膜である。更に、本発明は、連続キャビティを有するウェルウォールアレイ及びウェルウォールアレイに結合した1つ又はそれ以上の光学的に透明なボトムプレートを含むマルチウェルアセンブリに関する。前記系は、ボトムプレートが、受容分子又は低い非特異的タンパク吸着が存在する分子で誘導体化されたフィルムで被覆されている。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 連続ウェルを有するウェルウォールアレイ（1）及びそれに取り付けられた1つ又はそれ以上の光学的に透明なボトムプレート（2）からなるマルチウェルアセンブリにおいて、専らボトムプレートが分子の共有結合形での固定化に適した官能基を有する多糖誘導体の少なくとも1つの単分子層（3）で被覆されていることを特徴とする、マルチウェルアセンブリ。

【請求項2】 ウェルウォールアレイ（1）がプラスチックからなる、請求項1記載のマルチウェルアセンブリ。

【請求項3】 ウェルウォールアレイ（1）が光に対して不透明な材料からなる、請求項1又は2記載のマルチウェルアセンブリ。

【請求項4】 ボトムプレート（2）が石英ガラスからなる、請求項1から3までのいずれか1項記載のマルチウェルアセンブリ。

【請求項5】 多糖誘導体の少なくとも1つの単分子層（3）が自己アセンブリ法又はラングミュアープロジェクト技術により施与されたものである、請求項1から4までのいずれか1項記載のマルチウェルアセンブリ。

【請求項6】 多糖誘導体の少なくとも1つの単分子層（3）がセルロースベースのラングミュアープロジェクト膜である、請求項1から5までのいずれか1項記載のマルチウェルアセンブリ。

【請求項7】 ボトムプレート（2）が接着剤を用いてウェルウォールアレイに取り付けられている、請求項1から6までのいずれか1項記載のマルチウェルアセンブリ。

【請求項8】 接着剤が光硬化性接着剤である、請求項7記載のマルチウェルアセンブリ。

【請求項9】 連続ウェルを有するウェルウォールアレイ及びそれに取り付けられた1つ又はそれ以上の光学的に透明なボトムプレートを含むマルチウェルアセンブリにおいて、専らボトムプレートが受容体分子で誘導体化されたフィルムで被覆されていることを特徴とする、マルチウェルアセンブリ。

【請求項10】 連続ウェルを有するウェルウォールアレイ及びそれに取り付けられた1つ又はそれ以上の光学的に透明なボトムプレートを含むマルチウェルアセンブリ。

ルアセンブリにおいて、専らボトムプレートがウシ血清アルブミン、オリゴエチレンオキシド鎖を含有している物質、フッ素化炭化水素又は多糖を含むフィルムで被覆されていることを特徴とする、マルチウェルアセンブリ。

【請求項 1 1】 光学的分析方法のための、請求項 1 から 1 0 までのいずれか 1 項記載のマルチウェルアセンブリの使用。

【請求項 1 2】 請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項記載のマルチウェルアセンブリを製造する方法において、次の工程：

- a) ボトムプレート上に多糖誘導体の少なくとも 1 つの単分子層を施与し；
 - b) 取り付けるべきボトムプレートとの接触面を形成するウェルウォールアレイのエッジに接着剤を塗布し；
 - c) こうして処理したウェルウォールアレイを、被覆されているボトムプレートに押しつける
- ことを特徴とする、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項記載のマルチウェルアセンブリの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、マルチウェルアセンブリ (Mehргефаессанordnung) 及びこのマルチウェルアセンブリの使用に関する。

【0002】

マイクロタイタープレートのようなマルチウェルアセンブリは、生化学的分析学において標準となっている、それというのも、これらは、殊に、多数の分析又は検定を並行してかつ自動化できるようになる利点を有するからである。そのような検定は、例えば ELISA 試験 (固相酵素免疫検定法)、化学製品、タンパク質及び DNA の濃度の決定又はシンチレーション測定、蛍光測定、りん光測定又はルミネセンス測定等の際の α 線、 β 線及び γ 又は γ 線の決定を含んでいる。更に、マルチウェルアセンブリは、自動化された細胞培養分析にとって有利であることがわかっている。概して、分析は、マルチウェルアセンブリ中の試料が、UV/VIS 波長範囲からの光で照射され、かつ試料の放出又は吸収が、適した検出器により決定されるようにして行われる。しかしながら、これらの測定の感度は、マルチウェルアセンブリを製造するために使用されるプラスチック、概してポリスチレンの光学的性質に基づいて制限されていた。従って、最近では、マルチウェルアセンブリの光学的性質を、適した材料を選択することによって又はマルチウェルアセンブリの適したジオメトリーを選択することによって改善することが尽力されている。例えば、欧州特許出願公開第 0797088A1 号明細書には、特に高い UV 透過率を有するプラスチック材料からなるボトムを有しているマルチウェルアセンブリが開示されている。しかしながら、そのようなマルチウェルアセンブリの感度は、依然として単独分子までのごく僅かな試料量が部分的にのみ分析すべきである場合、例えばコンビナトリアルケミストリーによって製造される物質ライブラリの場合には、複数の検定にとって不十分である。

【0003】

従って、本発明による課題は、光学的分析方法のために改善された感度を有するマルチウェルアセンブリを提供することである。

【0004】

この課題は、本発明によれば、連続するウェルを有しているウェルウォールアレイ (Gefuesswandmatrix) (1) 及びそれに取り付けられた1つ以上の光学的に透明なボトムプレート (2) を含むマルチウェルアセンブリによって解決され、その際、ボトムプレートが、分子の共有結合形での固定化に適した官能基を有しているフィルム (3) で被覆することによって特徴づけられる。

【0005】

図1及び2は、本発明による好ましいマルチウェルアセンブリを示している。図1は、連続するウェルを有しているウェルウォールアレイ (1) 及びそれに取り付けられ、フィルムで (3) を被覆された光学的に透明なボトムプレート (2) からなる本発明によるマルチウェルアセンブリを示す。図2は、連続するウェルを有しているウェルウォールアレイ (1) 及びそれに取り付けられ、フィルム (3) で被覆された複数の光学的に透明なボトムプレート (2) からなる本発明によるマルチウェルアセンブリを示し、その際、ウェルウォールアレイのウェル1個あたり1つのボトムプレートが存在する。

【0006】

本発明によるマルチウェルアセンブリは、先行技術のマルチウェルアセンブリとは異なり、それによって光学分析が実施されるマルチウェルアセンブリ及び、単に流体を保持するに過ぎず、かつ概して分析とは無関係であるウェルウォールのボトムの表面特性の独立した制御を可能にする。意外なことに、ボトム表面特性のこの制御によって、強化されているマルチウェルアセンブリで光学的分析方法の感度は高められることができる。

【0007】

本発明によるマルチウェルアセンブリは、ウェルの数に基づいて制限されず、かつ殊に24 (4 * 6)、48 (6 * 8)、96 (8 * 12)、384 (16 * 24)、864 (24 * 36) 又は1536 (32 * 48) のウェルを有しているマルチウェルアセンブリを含むが、しかしこれらの構成に限定されない。しかしながら、本発明の優れた点は、ウェルの数が増大すればするほどよりはっきりする、それというのも、これが増大している表面/体積比率を伴う、即ち、表面効果は、ウェルの数が増大すればするほどより関連してくるからである。マルチ

ウェルアセンブリの寸法は、好ましくは“Society of Biomolecular Screening” (SBS) 規格に向けられており、即ち、マルチウェルアセンブリは、好ましくはかつウェルの数に関係なく、幅86mm及び長さ128mmである。

【0008】

本発明により使用すべきウェルウォールアレイ(1)は、好ましくはプラスチック材料、特に好ましくは、分析すべき物質、例えばDNA又はタンパク質のために低い非特異的吸収を有するようなプラスチック材料からなる。ウェルウォールアレイのための好ましい材料は、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリエチレン及び/又はポリプロピレンを含む。更に、ウェルウォールアレイとして本発明により使用されうるのは、その表面がウェルウォールアレイでの分析物の吸収を低下させるウェルウォール材料上にフィルムを形成する物質で被覆されているプラスチックである。適した物質は、これに関して、特にウシ血清アルブミン、フッ素化炭化水素、オリゴエチレンオキシド含有のポリマー、例えばプルロニックの物質クラスのポリマー並びに多糖、例えばセルロース誘導体及びデキストラン誘導体を含む。更に、ウェルウォールアレイ(1)のプラスチックは、個々のウェルの間での光学的クロストークを防止するために、有利に光学的に不透明な物質、例えば二酸化チタン又はカーボンブラックを含む。ボトムプレート(2)と結合しているウェルウォールアレイ(1)の面は、概して、特に多数のウェルの場合に平面である。より少数のウェル、ひいては概して各ウェルのより大きな表面の場合には、各ウェルもしくはウェルの群、例えば4個又は9個のウェルもまた、それに取り付けるべきボトムプレートのサイズのキャビティを有し、即ちこの場合に、ウェル1個あたり又はウェルの群1個あたり1個のボトムプレートが使用される。これは製造に関しては好ましくないけれども、本発明によるそのようなマルチウェルアセンブリは、その感度増強に好ましいかもしれない、それというのも、ボトムに沿った個々のウェルの間の光学的クロストークを防止できるからである。本発明により使用されるウェルウォールアレイのウェルは、円形、矩形又は正方形であってよい。本発明によれば円形のウェルが好ましい、それというのも、これらは、同じ体積で正方形のウェルよりも小さい表面を有し、ひいてはそれ以外は同じ性質で分析物のより少ない吸収をもたらすからである。

【0009】

マルチウェルアセンブリの本発明により使用可能な光学的に透明なボトムプレート(2)は、有利に、検定が実施される波長範囲において、特に高い透過を有する。複数の光学測定のためには、特に石英ガラス又はホウケイ酸ガラスは好ましいが、しかし、他の材料、例えばMitsui Petrochemical Industries、日本の4-メチルペンテン-1-ポリマーTPX(R)又はポリメチルメタクリレートが使用されてもよい。本発明により使用されるボトムプレート(2)は、好ましくは僅かな厚さを有し、特に好ましくは200 μ m未満の厚さ、殊に130~170 μ m、特に好ましくは150 μ mの厚さである。できるだけ薄いボトムプレートは、特に、使用すべき検定にとって、強く集束した光又は高い開口数を有している対物レンズが、例えば蛍光相関分光分析の際に使用される場合に、望ましい。できるだけ僅かな表面粗さを有しているボトムプレートは特に好ましい。ボトムプレートの寸法は、ウェル1個あたり1個のボトムプレートが使用される場合には、ウェルの数に依存する。24-アレイにおいて、サイズは約17mm*17mmであってよい。1個のボトムプレートのみが本発明によるマルチウェルアセンブリに使用される場合には、ボトムプレートのサイズは通常75mm*115mmである。

【0010】

分子の共有結合形での固定化に適した官能基を有している、本発明によるマルチウェルアセンブリのボトムプレートの被覆として使用されるフィルム(3)は、ボトム表面、即ち分析に関連している表面の目標とする表面変性を可能にする。これにより、意外なことに、光学測定の感度が高められることができる。

【0011】

フィルム(3)の種類は制限されるのではなくて、この適した官能基を有し、かつ例えばシランフィルム、ラングミュアープロジェクト膜及びヒドロゲルフィルム、例えばデキストランフィルムを含む。

【0012】

このフィルムの官能基は、制限されるものではなく、かつ例えば、ヒドロキシ、アミノ、アルデヒド及びカルボキシ基を含む。好ましくは、これらの基は、保

護されて存在し、即ちこれらの基の分子の共有結合形での固定化前に保護基が開裂されていなければならない。適した保護基は当業者に公知である。

【0013】

本発明により使用されるフィルムは、好ましくはラングミュアープロジェクト膜、特に二次元又は三次元に架橋可能なラングミュアープロジェクト膜、特に好ましくは多糖ベース、殊にセルロースベースのラングミュアープロジェクト膜である。有利に、本発明により使用可能なフィルムは、光化学的に架橋可能である。本発明により使用可能なラングミュアープロジェクト膜は、受容体の固定化後に、これらが低い非特異的吸収で高い特異的吸収を有し、場所的に安定であり、かつトポグラフィー的に高度に定義された表面を提供するという利点を有する。

【0014】

ラングミュアープロジェクト膜のための多糖誘導体又はセルロース誘導体は、好ましくは5を上回る重合度及び特に好ましくは、a) 少なくとも1つの疎水性置換基及びb) 窒素原子を有する少なくとも1つの置換基を有する混合されたセルロースエーテルが示される。

【0015】

好ましい実施態様において、混合されたセルロースエーテルは、置換基a) としてトリアルキルシリル基及び置換基b) としてアミノアルキル基を有し、その際、アルキル基は、特に、置換基a) 中に1又は2個のC原子及び置換基b) 中に2～8個のC原子を有する。付加的に、多糖誘導体は、また、c) 光化学的、ラジカル的又は熱的に架橋可能な基を有する少なくとも1つの別の置換基を含有していてもよい。

【0016】

好ましい混合されたセルロースエーテルは、主として、セルロース構造のOH基のHの一部が、有機又はオルガノシリル基と置換されている、即ち直接Oに隣接している原子がC又はSiである化合物であると理解される。更に、この名称は、しかし、付加的に別の置換基を（特にOH基のOに）有する誘導体でもあることが理解されうる、例えば置換基c) がそのようなものである。具体的な分子 (Lothar Brandt in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Volume.

A5, 2nd edition, under "Cellulose Ethers", 第461頁以降参照)において、セルロースエーテル分子中の各分子単位(アンヒドログルコース単位)が1つ以上のOH基で置換されている必要はなくて、化合物の名称は、分子又は分子単位の全体に関係しており、即ち平均値の名称を表しており; 一般に分子単位1個あたり3個以下のOH基が置換可能である。置換基a)又はc)(しかしb)ではない)を有するセルロース誘導体の製造又は挙動に関しては、Frank Loescher他, Proc.SPIE Vol. 2928, 1996, 第209~219頁及びDieter Klemm他, Z.Chem. 第24版(1984), No.2, 第62頁, "4-dimethylamino-pyridin-katalysierte Synthese von Celluloseestern ueber organoloesliche Synthese von Celluloseestern ueber organoloesliche Trimethylcellulose" が参照される。

【0017】

ボトムプレートを被覆するためには、多糖誘導体の少なくとも1個の単分子膜、好ましくはその2~10個の単分子膜がボトムプレートに適用され、その際、これらは、置換基a)として好ましくはアルキル、アルケニル、アリール、アルキルシリル、アルケンシリル及び/又はアリールシリル基を有する疎水性置換基、しかし、ラングミュアープロジェクト(LB)技術及び/又はラングミュアープロジェクト-シェーファー(LBS)技術での表面への被覆を可能にする他の置換基も有する。

【0018】

この層の施与は、溶液中でのインキュベーションによって、自己アセンブリ(SA)法によって又は好ましくはラングミュアープロジェクト技術又はラングミュアープロジェクト-シェーファー技術によって行われることができる。多糖誘導体は、親水性及び疎水性の表面への粘着に適している。ひいては、この物質クラスが表面変性するフィルムとして施与されることができ、かつ使用されることができる。

【0019】

これらの層が、光重合可能又は熱重合可能な基、例えばシンナモイル基、しかし化学において公知の全ての他の基が分子中に配合される場合に、付加的に安定化されてもよい、それというのも、これらは、移動前、移動中又は移動後に、重

合によって層の架橋性の安定化をもたらすからである。

【0020】

この際、重合可能な基が、前記の多糖誘導体に適用されることができ、又は、しかしながら、層上で又は層中に多糖誘導体と混合されて適用される別の分子の形で存在していてもよい。重合が、単分子層内で行われてもよい；しかし、複数の単分子層が重なり合って存在する場合には、重合もまた個々の層の分子の間で行われてもよい。

【0021】

本発明によるマルチウェルアセンブリは、次のようにして製造されることができる。

【0022】

ボトムプレートは、フィルムで、例えば前記のラングミュアープロジェクト膜で被覆される。予備成形されたウェルウォールアレイ、例えばポリスチレンの射出成形により製造されたウェルウォールアレイは、別個の処理工程において最初に、例えば超音波処理により清浄化される。この後に、ウェルウォールアレイは、好ましくは、ウェルウォールアレイのウォールでの分析物、例えばタンパク質又はDNAの吸収を減少させる物質を含む溶液、例えばウシ血清アルブミン中に浸漬される。ついでウェルウォールアレイの乾燥が行われる。

【0023】

塗布すべきボトムプレートとの接触面を形成するウェルウォールアレイのエッジに、接着剤、例えばシリコーンゴム接着剤、エポキシ樹脂接着剤又はアクリレート接着剤（例えばLoctite）は、例えばロールを用いて適用される。

【0024】

光活性化可能な一成分接着剤が特に好ましい。こうして予備処理されたウェルウォールアレイは、ラングミュアープロジェクト膜で被覆されたボトムプレート上に慎重に押しつけられる。選択的に、ウェルウォールアレイとの接触面に相当するパターンで、接着剤をボトムプレート上にシルクスクリーン印刷を用いて直接施与されてもよい。こうして本発明によるマルチウェルアセンブリが得られる。接着したボトムプレートは、好ましくは、プラスチック体の外側エッジに対し

て、約1mmの最小レベル差のみを有する。従って、本発明によるマルチウェルアセンブリの全てのウェルが光学的にボトム側で測定されることができ、かつウェルウォールアレイのエッジによる計測光学の立体障害が起こらないことを保証する。

【0025】

本発明によるマルチウェルアセンブリの行われた製造後に、表面は好ましくは蓋及び／又は箔によって保護されている。蓋は、本発明によるマルチウェルアセンブリの頂部に強制的に位置決めされるように好ましくは設計されている。更に、マルチウェルアセンブリの強制的に位置決めされたスタックも可能にする。蓋のサイズは、好ましくは約86mm*128mm*8mmである。箔の使用は、例えばウェルに、流体が箔を突き通す針付きの注射器によって導入される場合に、ボトムプレート表面も保護されたままであるという利点を有する。

【0026】

本発明によるマルチウェルアセンブリのボトムに、分子は、分析法又は検定の種類に応じて表面特性を決定する光学検定を実施するために共有結合されていてもよい。その際、均一測定法と不均一測定法とを、即ち分析物が溶液中に存在する場合の検定と、分析物、例えば受容体又は配位子が、表面に存在する配位子又は受容体に結合する場合の検定とを区別すべきである。本発明によるマルチウェルアセンブリが特に有利に使用されうる均一測定法には、蛍光相関検定(Fluoreszenzkorrelations-Assay)、蛍光偏光イムノアッセイ(Fluoreszenzpolarisations-Immunsorbent-Assay)及びフェルスターエネルギー移動検定(Foerster-Energie transfer-Assay)が属する。本発明によるマルチウェルアセンブリが特に有利に使用されうる不均一測定法には、ボトム表面に分析物を濃縮することが有利である全ての光学検定、例えばエバネッセンス検定(Evanescenzassay)又は蛍光励起のために表面が高度に集束したレーザー光線で走査する検定が属する。

【0027】

検定の種類に応じて、ボトムプレート上の表面フィルムは、分子で誘導体化される。均一測定法の際に、分子を固定化することにより、こうして表面での分析物の高い可動性を確実にするために分析物の最小限の吸収を目的とするのに対し

て、不均一測定法の際には、分析物の固定化を目的とする。従って、均一測定法の際に、フィルムは好ましくは、例えばウシ血清アルブミン、オリゴエチレンオキシド鎖を含んでいる物質、フッ素化炭化水素又は多糖、例えばセルロース誘導体又はデキストラン誘導体で変性される。それに対して、不均一測定法の際に、フィルムに、分析物を結合させることができる物質が結合される。分析物の種類に応じて、当業者には、どのようにして、分析物、例えばDNA、タンパク質、例えば抗体又はペプチドと結合することができる、適した物質を選択すべきであるかは分かっている。

【0028】

分子の共有結合形での固定化は、直接、表面フィルムの反応性基に又は保護基を予め開裂した後に行われてもよい。前記のラングミュアープロジェクト膜の場合には、例えば分子の直接結合に、存在するアミノアルキル基が適している。アミノアルキル基は求核試薬として用いられ、かつ求電子基を有する分子と共有結合を形成する。他方では、フィルムがシリル基、例えばトリアルキルシリル基、トリアリールシリル基又はトリアルケニルシリル基を有する場合には、表面特性は、シリル基が被覆後に開裂されるので、ヒドロキシ基が残留するように変えられてよい。これは、例えば酸に暴露することにより達成可能である。これらのヒドロキシ基は、共有結合形での固定化のための官能基として用いられてもよい。

【0029】

分子が固定化された後に、検定は当業者に公知の方法によって実施されることができる。

【0030】

比較実験

1. 例1

(a) ガラスプレートを、アミノアルキルトリメチルシリルエーテルセルロース(ATMSC)の層で、引き続きシンナモイルトリメチルシリルエーテルセルロース(CTMSC)の層で被覆した。被覆方法の詳細に関して、“ultrathin cellulose based layers for detection of single antigen molecules, Advanced Materials 1998, 10, No. 13”が参照される。ついでストレプトアビジン

ンをLemieux酸化によってセルロース表面に結合させた（付言した刊行物参照）。

【0031】

（b）それに並行してプラスチックフレーム、即ちウェルウォールアレイを1時間、室温で0.2mg/mlのウシ血清アルブミンと共にインキュベートした。

【0032】

（c）引き続き、プラスチックフレームを、セルロース変性したガラスプレートに接着させた。

【0033】

（d）測定のために、ついで、Regensburg大学で合成された10⁻¹⁰Mビオチン-CY5コンジュゲート0.08mlを、マルチウェルアセンブリのウェル中にピペットで移しかつその中で1時間、室温でインキュベートした。引き続いて、リン酸塩緩衝液（PBS）で二度洗浄し、かつ表面へのビオチン-CY5コンジュゲートの結合を、LB8（R）カウンター（MMI社、ハイデルベルク）を用いて共焦点蛍光分光分析法によって測定した。0.5mm毎に10本の線及び1本の線当たり200.0の測定点を測定した。1点当たりの測定時間は0.5secであった。300カウントを事象として評価した。測定を二回実施した。

【0034】

（e）事象43892もしくは46253の値が得られた。

【0035】

2. 例2

マルチウェルアセンブリを、例1で同じように製造したが、但しプラスチックフレームを0.2mg/mlウシ血清アルブミンではなく0.1mg/mlストレプトアビジンでインキュベートした。以降の測定も、本発明による例と同じように実施したが、但し事象1663及び事象2170の値が得られた。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明による好ましいマルチウェルアセンブリの一例を示す略図。

【図2】

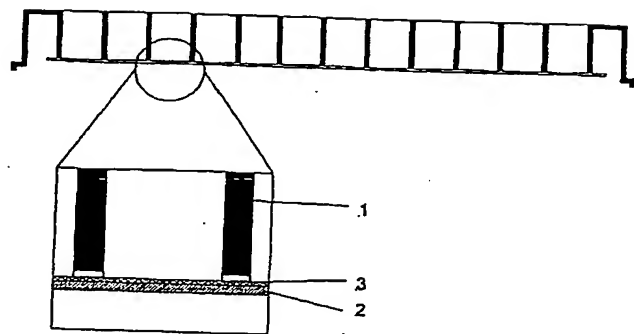
本発明による好ましいマルチウェルアセンブリの一例を示す略図。

【符号の説明】

1 ウェルウォールアレイ、 2 ボトムプレート、 3 フィルム

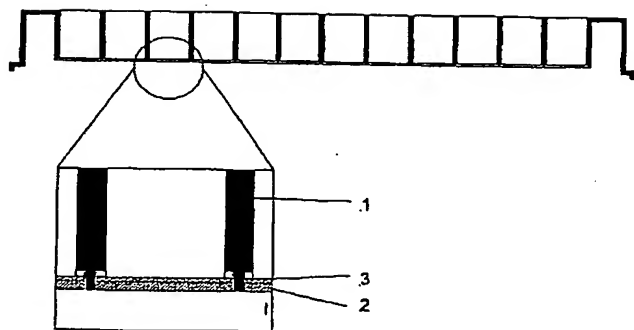
【図 1】

Fig. 1



【図 2】

Fig.2



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 B01L3/00 //G01N21/05, G01N33/48, G01N33/50, C12M1/14, C12Q1/68		Int. Application No. PCT/EP 99/08891
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 B01L G01N C12Q C12M		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 03538 A (BALZERS HOCHVAKUUM ;ARTIFICIAL SENSING INSTR ASI A (CH); RUDIGIER) 2 February 1995 (1995-02-02) page 1, line 2 -page 1, line 14 page 5, line 18 -page 7, line 16 page 7, line 21 -page 7, line 25 figures 1-4 --- -/--	1, 4, 9, 11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date obtained "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "F" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 January 2000		Date of mailing of the international search report 04/02/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2290 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Koch, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.
PCT/EP 99/08891

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 347 579 A (MESSERSCHMITT BOELKOW BLOHM) 27 December 1989 (1989-12-27) column 2, line 41 -column 2, line 53 column 3, line 20 -column 3, line 31 column 3, line 37 -column 3, line 44 column 3, line 50 -column 4, line 13 column 5, line 24 -column 5, line 28 column 5, line 34 -column 5, line 45 column 6, line 14 -column 6, line 29 column 8, line 8 -column 8, line 40 figures 1-10	1-3, 7, 9, 11
A	EP 0 797 088 A (CORNING COSTAR CORP) 24 September 1997 (1997-09-24) cited in the application page 2, line 10 -page 2, line 17 page 2, line 26 -page 2, line 31 page 2, line 47 -page 2, line 52 page 2, line 57 -page 3, line 14 page 4, line 7 -page 4, line 19 page 4, line 39 -page 4, line 58 page 5, line 34 -page 6, line 6 page 6, line 28 -page 6, line 40 figures 1-6 page 3	1-4, 7, 9-11
A	US 5 236 871 A (FOSSUM ERIC R ET AL) 17 August 1993 (1993-08-17) column 5, line 60 -column 6, line 48 figure 5	5, 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

 International Application No.
 PCT/EP 99/08891

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9503538 A	02-02-1995	DE 69420375 D EP 0660924 A JP 8504955 T US 5738825 A	07-10-1999 05-07-1995 28-05-1996 14-04-1998
EP 0347579 A	27-12-1989	DE 3818614 A DE 3825907 A AT 103508 T DE 58907327 D US 5252294 A DE 8817007 U	07-12-1989 01-02-1990 15-04-1994 05-05-1994 12-10-1993 02-10-1991
EP 0797088 A	24-09-1997	US 5858309 A JP 10078388 A	12-01-1999 24-03-1998
US 5236871 A	17-08-1993	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ペーター シューベルト
ドイツ連邦共和国 ダルムシュタット ヤー
ンシュトラッセ 127

(72)発明者 シュテファン ゼーガー
ドイツ連邦共和国 パート アバッハ ゲ
ーテシュトラッセ 2

Fターム(参考) 2G057 AA04 AB01 AB03 AC01 BA01
BA03 BB01 BB02 BB06
4G057 AB39

【要約の続き】

